

EP00/5313

EPO - Munich  
62  
28. Juli 2000

4



REC'D 21 AUG 2000

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 199 26 083.4  
**Anmeldetag:** 08. Juni 1999  
**Anmelder/Inhaber:** Universitätsklinikum Freiburg,  
Freiburg/DE  
**Bezeichnung:** Biologisches Gelenkkonstrukt  
  
**IPC:** A 61 C, A 61 F, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 06. Juli 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Hiebinger

LEDERER, KELLER RIEDERER

Patentanwälte - European Patent Attorneys

R. A. VAN DER WERTH  
(1934 - 1974)

DR. FRANZ LEDERER  
Dipl.-Chem. München

DR. GÜNTER KELLER  
Dipl.-Biol. München

DR. MICHAEL BEST  
Dipl.-Chem. München

ANTON FRH. RIEDERER v. PAAR  
Dipl.-Ing. Landshut

80538 MÜNCHEN  
Prinzregentenstraße 16  
Telefon (089) 21 23 99 0  
Telefax (089) 21 23 99 22  
E-Mail lederer\_keller@compuserve.com

8. Juni 1999  
K/Ka/Me

Universitätsklinikum Freiburg  
Hugstetter Str. 49

79106 Freiburg

---

### Biologisches Gelenkkonstrukt

---

Die vorliegende Erfindung betrifft ein biologisches Gelenkkonstrukt und Verfahren zu seiner Herstellung sowie Knochengewebe, das transfizierte Zellen enthält und Verfahren zu dessen Herstellung.

Gelenkdefekte können bislang chirurgisch nur durch Gelenkresektion, Gelenkversteifung, alloplastischen Ersatz mit Kunststoff- oder Metallimplantaten bzw. Materialkombinationen daraus, oder durch biologische Implantate behandelt werden. Alloplastische Implantate werden jedoch nicht integriert und lockern sich unter Belastung. Als biologisches Implantat können nur Fremdgewebe, beispielsweise Kniegelenke als sogenannte Allotransplantate verwendet werden. Fremdgewebeverpflanzungen erfordern eine lebenslange Immunsuppression mit Gefahren der Weichteiltumorentstehung. Ein autogener biologischer Ersatz

kann bisher nur teilweise durch Einzelkomponenten erfolgen. Neben den bekannten chirurgischen Maßnahmen beinhalten wissenschaftliche Ansätze gegenwärtig die Rekonstruktion kleiner Knorpeldefekte durch eine Knorpelzelltransplantation mit einem Knochenhautlappen (Brittberg-Methode). Es gab verschiedene Ansätze, Einzelkomponenten zu rekonstruieren:

Das US-Patent 5,053,050 beschreibt Zusammensetzungen zur Reparatur von Knorpel oder Knochen, wobei Knorpel- oder Knochenzellen in eine biologische, resorbierbare Trägersubstanz eingebracht werden, welche Serum, Fibrinogen und Thrombin enthält. Die US-Anmeldung 5,041,138 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung einer Knorpelstruktur durch Besiedelung einer Trägersubstanz mit Knorpelzellen. In ähnlicher Weise betrifft die US-Anmeldung 5,786,217 ein Verfahren zur Herstellung eines vielzelligen Knorpelkonstrukts, worin Knorpelvorläuferzellen auf ein Trägermaterial aufgebracht werden und durch weiteres Kultivieren differenzieren und Knorpelsubstanz bilden. Das US-Patent 5,736,372 beschreibt eine polymere Trägersubstanz, die Chondrozyten enthält und geeignet ist, um in vivo Knorpelstrukturen zu bilden. Es ist bekannt, daß bestimmte Wachstumsfaktoren die Proliferation von Zellen verschiedenster Art stimulieren können. Die internationale Anmeldung WO 95/22611 beschreibt Verfahren und Zusammensetzungen zum Gentransfer in Knochenzellen in vivo, insbesondere zum Gentransfer von osteotropen Genen, die das Wachstum von Knochenvorläuferzellen in vivo stimulieren sollen.

Bislang sind also erfolgreich lediglich Einzelkomponenten rekonstruiert worden, zum Beispiel Knochen oder Knorpel. Biologische Einzelkomponenten können komplexe, meist osteochondrale Defekte aber nicht ausreichend rekonstruieren. Ungelöst ist nach wie vor die Rekonstruktion komplexer Gelenkstrukturen bzw. der komplette biologische Gelenkersatz mit Knochen-, Knorpel-, Kapsel- und Bandanteilen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein vorteilhaftes biologisches Gelenkkonstrukt zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße biologische, zumindest teilweise in vitro hergestellte Gelenkkonstrukt gelöst. Im Rahmen dieser Anmeldung bedeutet "in vitro", daß ein Prozeß außerhalb des tierischen oder menschlichen Körpers stattfindet. Dazu zählt auch die sogenannte "ex vivo"-Manipulation von Zellen, also das Kultivieren von isolierten Zellen, ihre Vermehrung und Veränderung. Es handelt sich aber nicht um ein im menschlichen oder tierischen Körper natürlich gewachsenes Gelenkkonstrukt. Das erfindungsgemäße Gelenkkonstrukt umfaßt wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial, Knorpelgewebe enthaltend Chondrozyten und/oder Chondroblasten und Knorpelsubstanz, Knochengewebe enthaltend Osteoblasten und/oder Osteocyten und Knochensubstanz, wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind.

Trägermaterialien sind Materialien, die keine zytotoxischen Effekte besitzen, die die Anhaftung von Zellen ermöglichen und die Proliferation und Differenzierung der Zellen zu gewebesynthetisierenden Zellen erlauben. Weiterhin sollte das Material einen stabilen, physiologischen pH-Wert aufweisen. Zur Analyse dieser Kriterien können folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

Durch Elektronenmikroskopie kann die Oberflächentopographie des Materials analysiert werden und die Anhaftung der Zellen überprüft werden. Stoffwechseltests, beispielsweise der XTT-Test (cell proliferation kit, erhältlich von Roche Diagnostics, Mannheim) liefern eine Aussage über die Proliferation der Zellen durch Messung ihrer Stoffwechselaktivität. Damit kann ein zytotoxischer Effekt ausgeschlossen werden. Durch histologische Methoden können die gewebetypischen Matrices von Knorpel, Knochen oder Kapsel nachgewiesen werden. Die

gewebetypische Matrix kann auch durch immunhistochemische Verfahren bestimmt werden.

Für Knorpelgewebe werden als Trägersubstanz bevorzugt schwammartige Vliese, visköse, gelierende und sich verfestigende Gele oder netzartige Fadengewebe eingesetzt. Als biologische Varianten kommen dabei Fibrin-Thrombin-Komplexe, Kollagengele oder Alginat in Betracht. Als synthetische Materialien sind Kollagen, Hydrogele oder visköse Polymere denkbar. Sollen für Knorpel vliesartige Trägermaterialien verwendet werden, so können als biologische Variante Kollagenvliese und als synthetische Varianten Polylactid, Polyglycolid oder Polyurethan verwendet werden.

Die Trägermaterialien für Knochen weisen in der Regel eine feste, formbare bzw. bearbeitbare, dreidimensionale poröse Struktur auf (Porosität ca. 80-90%), wobei die Poren untereinander verbunden sein können. Die Oberflächentopographie sollte leicht gerauht sein. Trägersubstanzen können im wesentlichen aus Kollagen, Calciumphosphat oder Fibrin bestehen. Sie können jedoch auch aus synthetischen Polymeren bestehen. Als Knochen-Trägermaterialien können folgende stabile, dreidimensionale, poröse Materialien verwendet werden: humaner oder animaler spongiöser Knochen, gesinterter Knochen, Korallenmatrix, demineralisierte Knochenmatrix (biologische Varianten), Calciumphosphat-Verbindungen, Polylactid, Polyglycolid, andere Polymere (synthetische Varianten). Als visköse, gelierende und sich verfestigende Gele sind folgende Materialien einsetzbar: Fibrin-Thrombin-Komplexe, Kollagengele, Alginat (biologische Varianten), Hydrogele, visköse Polymere (synthetische Varianten). Die Knochen-Trägermaterialien können weiterhin mit Haftmolekülen beschichtet sein, die die Anheftung von Zellen erleichtern. Solche Haftmoleküle sind bevorzugt Fibronectin oder Laminin. Wesentlich ist, daß keine Abstoßungsreaktionen gegen die Trägermaterialien in dem Empfängerorganismus auftreten.

Für Kapselkomponenten sind bandförmige Gewebenetze oder Vliese geeignet. Als Trägermaterialien zur Herstellung von Bandkomponenten sind allgemein membranartige synthetische resorbierbare Fasermaterialien einsetzbar, beispielsweise Polyglactin, Polyglycolsäure, Polymilchsäure oder Hyaluronsäure.

Die Trägermaterialien für Bandkomponenten können auch als Trägermaterialien für Kapselkomponenten verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Spongiosa als Trägermaterial der Knochenkomponente. Überraschenderweise wurde gefunden, daß Spongiosa sehr gut geeignet ist, um Knochenvorläuferzellen zur Synthese von Knochensubstanz anzuregen. Vorzugsweise handelt es sich dabei um autoklavierte, humane, allogene Spongiosa, die aus Hüftköpfen gewonnen wird. Am bevorzugtesten wird das Material aus Hüftköpfen gewonnen, die durch Wasserstrahl und Ultraschallbehandlung von losem Stroma gereinigt werden. Anschließend erfolgt Autoklavierung bei 134°C und 2,5 bar zur Sterilisation. Das Material ist steril, nicht immunogen, resorbierbar und besteht aus Hydroxylapatit und denaturiertem Kollagen Typ 1.

Das in dem erfindungsgemäßen Gelenkkonstrukt enthaltene Knorpelgewebe enthält Chondrozyten und/oder Chondroblasten und Knorpelsubstanz. Unter Knorpelgewebe ist ein aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und - verschiedener - Grundsubstanz und verschiedenen Faserarten bestehendes viskoelastisches, gefäß- und nervenloses Stützgewebe zu verstehen. Unter Knorpelsubstanz ist die Grundsubstanz zusammen mit den verschiedenen Faserarten zu verstehen. Die Grundsubstanz enthält Glycosaminoglykane und Proteoglykane, vorzugsweise Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Weiter sind Proteine und Mineralbestandteile enthalten. Als Faserarten können elastische Fasern, kollagene Fibrillen oder kollagene Fasern vorkommen.

Unter Knochengewebe ist ein Gewebe zu verstehen, das aus Knochenzellen, kollagenen Fasern und einer verkalkten Grundsubstanz besteht. Knochensubstanz im Sinne der Anmeldung umfaßt Kollagen, Glycosaminglykane und Proteoglykane, sowie anorganische Substanzen, hauptsächlich Calciumphosphat, das in Form von Hydroxylapatit-Kristallen auftritt.

Erfindungsgemäß sind Knorpelgewebe und Knochengewebe des Gelenkkonstrukts fest miteinander verbunden. Dabei ist das Trägermaterial des Knochens mit der neuen Knochensubstanz verzahnt, es ist auch teilweise in die Knorpelkomponente integriert. Es liegt also keine scharfe Trennfläche zwischen Knochen- und Knorpelgewebe vor, vielmehr wird durch Verzahnung und Interdigitation eine feste Verbindung erreicht. Bevorzugt wird dies dadurch erreicht, daß das Knochengewebe eine raue bzw. poröse Oberfläche aufweist, in die das Knorpelgewebe einwachsen kann.

Die in dem Gelenkkonstrukt enthaltenen Knochen- und Knorpelzellen sind vor der Herstellung des Gelenkkonstrukts nach üblichen Methoden isoliert worden. Es können auch Vorläuferzellen isoliert werden, die erst während Kultur in vitro zu Knochen- oder Knorpelzellen differenzieren.

Vorzugsweise weist das Gelenkkonstrukt eine anatomisch sinnvolle Form auf, beispielsweise besitzt es eine Gelenkseite, deren Oberfläche aus Knorpelgewebe besteht und die Kontakt zu einem anderen Gelenkteil haben kann, und es besitzt eine Ankerseite, die zum Teil aus Knochengewebe besteht und die zur Verankerung des Konstrukts in einem Knochenschaft dienen kann. Die Ankerseite ist vorzugsweise in der Form eines zylinderförmigen Zapfens ausgebildet, der besonders gut in einem Knochenschaft verankert werden kann. Die Gelenkseite besitzt besonders bevorzugt eine konkave oder konvexe Oberfläche. Es sind aber auch andere Gelenkkonstruktformen

denkbar, je nach Art des Gelenks, für dessen Reparatur das Konstrukt verwendet werden soll.

Die erfindungsgemäßen Gelenkkonstrukte können ebenfalls wenigstens eine Bandkomponente aufweisen. Die Bandkomponente besteht beispielsweise aus einem strangförmigen, faserartigen oder membranösen Biomaterial. Sie kann an Bandverbindungsstellen der Knochenkomponente des erfindungsgemäßen Gelenkkonstrukts befestigt werden. Mögliche Befestigungsarten sind biologische Klebung, beispielsweise durch Fibrin-Thrombin-Komplexe, unterstützende, transossäre Naht oder der Durchzug durch die Knochenkomponente in einem Knochenkanal.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht in einem biologischen Gelenkersatz, der wenigstens zwei Gelenkkonstrukte umfaßt. Zwei Gelenkkonstrukte können dabei mit Ihren knorpelbeschichteten Gelenkseiten Kontakt zueinander haben, während die voneinander abgewandten Ankerseiten in zwei verschiedenen Knochenschäften verankert werden können. Dieser Gelenkersatz wird vorzugsweise weiter durch Anbringung von wenigstens zwei Bandkomponenten stabilisiert. Schließlich kann ein derartiger biologischer Gelenkersatz auch eine Gelenkkapsel aufweisen. Dazu wird ein membranöses Biomaterial an Kapselverbindungsarealen der Knochenkomponente entweder durch biologische Klebung oder durch Naht befestigt.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung eines biologischen Gelenkkonstrukts. Dieses Verfahren umfaßt die Bereitstellung einer Knochenkomponente, die Bereitstellung einer Knorpelkomponente, die Verbindung dieser beiden Komponenten sowie die Züchtung des resultierenden Konstrukts in vitro.

Die Bereitstellung der Knochenkomponente erfolgt durch Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials mit



Osteoblasten. Als Trägermaterialien kommen die obengenannten Trägermaterialien für Knochen in Betracht. Vorläuferzellen von Osteoblasten können durch kleine Knochenbiopsien des Beckens, Brustbeines, des Schädels und Kiefers oder von Röhrenknochen gewonnen werden. Aus den Knochenproben wird das lose Stroma herausgespült und nach Zentrifugation in einer Kulturflasche ausplattiert. Die festen Knochenanteile können ebenfalls in Kultur gebracht werden, da hieraus durch Migration weitere Zellen gewonnen werden können. Die auswachsenden Zellen werden im subkonfluenten Stadium gesplittet und zwei- bis dreimal passagiert. Alternativ zu Knochenproben können auch Aspirate von Knochenmark aus dem Becken oder aus dem Brustbein verwendet werden. Die Aspirate werden in Heparinmedium gespült, durch einen Dichtegradienten zentrifugiert, um rote Blutkörperchen abzutrennen und schließlich in einer Kulturflasche ausplattiert. Der osteoblastische Phänotyp der Zellen in Kultur kann durch Nachweis der knochenspezifischen Proteine Alkalische Phosphatase und Osteocalcin im Kulturmedium überprüft werden. Immunhistochemische Färbungen von Kontrollkulturen sind ebenfalls denkbar.

Vorzugsweise wird das Knochenträgermaterial durch eine Knochenzellsuspension in einer Aspirationskammer besiedelt. Üblicherweise wird das Knochenträgermaterial vor der Besiedelung durch Knochenzellen in anatomisch sinnvoller Weise geformt. Beispielsweise führt die Formgebung zur Ausbildung einer Gelenkseite, die zur Aufnahme einer Knorpelfläche dienen soll und zur Ausbildung einer Ankerseite, die der Verbindung mit einem Knochenschaft dienen soll.

Chondrozyten werden bevorzugt aus Biopsien von Knorpelgewebe des Ohres, der Rippe und der Gelenke durch enzymatische Auflösung gewonnen. Durch Beimpfung von Biomaterialien wie Kollagenschwämmen und Fibrinkleber können die Zellen organotypisch weiter vermehrt werden. Dadurch wird auch vermieden, daß sich die Zellen zu Fibroblasten

entdifferenzieren. Der chondroblastische Phänotyp bleibt erhalten. Zur Bereitstellung der Knorpelkomponente kann nun eine Suspension von Chondrozyten hergestellt werden entweder in einem flüssigen Medium oder in einem gelartigen Material. Beispielsweise können Knorpelzellen in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert werden und nach Mischen mit der Fibrinogenkomponente in eine bestimmte vorgefertigte Kulturform gegossen werden. Dadurch entsteht ein festes Gebilde, das mit Kulturmedium überschichtet wird und im Brutschrank gezüchtet wird. Alternativ können auch bioverträgliche Trägersubstanzen durch Knorpelzellen besiedelt werden. Beispielsweise werden Schwämme aus Kollagen mit Chondrozyten angeimpft. Die angeimpften Kollagenvliese können im Brutschrank kultiviert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Knochen- und Knorpelkomponente getrennt voneinander hergestellt und getrennt kultiviert. Nachdem die jeweiligen Zellen ausreichend Gewebe gebildet haben, werden Knochen- und Knorpelkomponente durch Fibrinklebung miteinander verbunden. Es ist wesentlich für die Erfindung, daß bei der Verbindung von Knochen- und Knorpelkomponente das Trägermaterial der Knochenkomponente in den Knorpel integriert wird. Das resultierende Konstrukt kann nun in vitro kultiviert werden, so daß die Zellen zur Anheftung und zur Synthese ihrer gewebespezifischen extrazellulären Matrix stimuliert werden, dadurch wird eine biologische Vernetzung der zusammengesetzten Komponenten erreicht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Knochen- und Knorpelkomponente nicht separat hergestellt und kultiviert. Vielmehr wird während des Abbindens des Fibrinklebers bei der Herstellung der Knorpelkomponente das Trägermaterial der Knochenkomponente, das noch nicht durch Osteoblasten besiedelt worden ist, in die Knorpelschicht gedrückt, so daß es fest eingebunden wird. Die Besiedelung durch Osteoblasten erfolgt erst später.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung umfaßt auch die Herstellung einer Bandkomponente aus faserartigen Materialien und Fibroblasten. Dabei können Fibroblasten aus Suspension auf bandförmige Materialien geimpft werden und im Brutschrank kultiviert werden. Ähnlich dazu können Ausführungsformen die Herstellung auch einer Kapselkomponente aus faserartigen, membranösen Materialien und Fibroblasten umfassen.

Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren das Anbringen von Bandverbindungsstellen oder Kapselverbindungsarealen an dem Trägermaterial der Knochenkomponente umfassen. Daran können Gelenkbänder bzw. Kapselkomponenten befestigt werden. Bandkonstrukte werden bevorzugt dadurch mit der Knochenkomponente verbunden, daß das Bandkonstrukt durch einen Bohrkanal in der Knochenkomponente hindurchgezogen wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe, wonach Knochen- oder Knochenvorläuferzellen isoliert werden, diese Zellen durch nicht-viralen Gentransfer mit einem Wachstumsfaktorgen transfiziert werden und zur Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials benutzt werden. Das entstehende Konstrukt wird schließlich in vitro weitergezüchtet. Gegebenenfalls werden die isolierten Zellen vor der Transfektion in vitro vermehrt. Die Transfektion kann stabil sein, bevorzugt ist jedoch eine transiente Transfektion. Die Transfektion kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. Beim Partikel-vermittelten Gentransfer werden Zellen durch eine sogenannte Genkanone (gene gun) mit Plasmid- oder nackter DNA-beschichteten Goldpartikeln beschossen. Alternativ dazu kann die Transfektion durch Elektroporation vorgenommen werden. Die bevorzugte Transfektionsmethode ist jedoch die Lipofektion. Bevorzugt werden dabei die Reagenzien Transfectam<sup>®</sup> (erhältlich von der Firma Promega), Fugene<sup>®</sup> (erhältlich von der Firma Roche Diagnostics) und Escort<sup>®</sup> (erhältlich von der Firma Sigma) verwendet.

Erfindungsgemäß werden die Zellen mit wenigstens einem Wachstumsfaktorgen transfiziert. Ein Wachstumsfaktor oder Cytokin im Sinne der Erfindung ist eine Verbindung, die die Proliferation und/oder Differenzierung von Zellen stimulieren kann. Die meisten Wachstumsfaktoren sind Proteine oder Peptide, so daß Gene, die für diese Proteine oder Peptide kodieren, transfiziert werden können. Bevorzugt sind diese Gene in Plasmide eingebaut, die zusätzliche regulatorische und Kontrollsequenzen enthalten, um die Expression des Gens zu gewährleisten. Zu diesen zusätzlichen Sequenzen zählen ein Replikationsursprung, eine Promotorsequenz, am bevorzugtesten abgeleitet vom Cytomegalievirus (CMV), gegebenenfalls eine Kozaksequenz, ein Polyadenylierungssignal, gegebenenfalls ein Gen, das Resistenz gegen ein Antibiotikum vermittelt. Gemäß der Erfindung können auch Nucleinsäuren transfiziert werden, die nur für ein Fragment eines Wachstumsfaktors kodieren, das aber die Aktivität eines Wachstumsfaktors besitzt.

Mögliche Wachstumsfaktoren, deren Gene transfiziert werden können sind "basic fibroblast growth factor" (bFGF), "insuline-like growth factor" (IGF I, II), "platelet derived growth factor" (PDGF-AA, -AB, -BB), "bone morphogenetic proteins" (BMP-1 bis BMP-20), "vascular endothelial growth factor" (VEGF), Faktor XIII (F XIII), "transforming growth factor  $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) und andere osteotrope Faktoren. Bevorzugt wird jedoch das Gen transfiziert, das für epidermalen Wachstumsfaktor kodiert (EGF).

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das bioverträgliche Trägermaterial nicht nur mit transfizierten Zellen, sondern auch mit nicht transfizierten Zellen besiedelt. Die isolierten Zellen können verschiedene Knochenzellen oder Knochenvorläuferzellen sein, bevorzugt sind es jedoch stromale Zellen.

Außerdem betrifft die Erfindung Knochengewebe, das wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial und Osteoblasten enthält, die in vitro durch nicht-viralen Gentransfer mit einem Gen, das für einen Wachstumsfaktor kodiert, transfiziert worden sind. Bevorzugte Ausführungsformen betreffen Knochengewebe, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe mit Hilfe von transfizierten Zellen hergestellt wurden.

Das erfindungsgemäße Knochengewebe hat zwei wesentliche Vorteile.

Zum Einen werden nicht-transfizierte Zellen durch die sezernierten Wachstumsfaktoren parakrin zur Proliferation angeregt. Das hat nicht nur eine verbesserte Besiedelung der Trägermaterialien während der in vitro-Phase zur Folge, sondern auch eine verbesserte Einbindung des Gewebes nach Implantation. Das Knochengewebe stellt dann in vivo Wachstumsfaktoren zur Verfügung, ist also ein "zelluläres Wachstumsfaktor-Liefersystem". Dabei treten die von anderen Verfahren bekannten Nachteile nicht auf: Es werden keine Zellen außer den gewünschten transfiziert. Es sind keine Risiken zu befürchten, die mit viralen Methoden einhergehen. Es müssen nicht wiederholt Dosen von rekombinantem Wachstumsfaktorprotein appliziert werden, da die Sekretion "physiologisch" erfolgt. Bei direkter Gabe von Wachstumsfaktor bestehen auch die Risiken biologischer Inaktivität oder mangelnder Reinheit des Proteins.

Der zweite wesentliche Vorteil besteht darin, daß bestimmte Wachstumsfaktoren nach Implantation des Gewebes eine Gefäßneubildung induzieren können. Die Gefäßneubildung ist eines der entscheidenden Probleme beim "TissueEngineering". Die Faktoren können somit zu einer verbesserten Vaskularisierung des Konstrukts führen, was ein wesentlicher Vorteil für die Eigenschaften des implantierten Gewebes ist.

Figur 1a) zeigt die Fusion der Knorpelkomponente mit dem Trägermaterial des Knochens. Während dem Verfestigungsvorgang der Knorpelkomponente wird das Trägermaterial der Knochenkomponente in das Knorpelkonstrukt eingedrückt.

Figur 1b) zeigt das Anbringen der Bandkomponenten. Biologische Bandkomponenten können an den Bandverbindungsstellen integriert werden (hier durch transossären Durchzug). Das Konstrukt hat eine Gelenkseite und eine Ankerseite für den Einbau in den Knochen.

Figur 1c) zeigt Ansichten eines Knorpel-Knochen-Konstrukts. Das Trägermaterial der Knochenkomponente wurde mit Osteoblasten besiedelt. Die Knorpelkomponente ist fest mit der Knochenkomponente Verbunden. Das Konstrukt hat eine anatomisch korrekte Form zum Gelenkersatz. Es weist eine Gelenkseite und eine Ankerseite auf.

Figur 1d) zeigt die Integration des biologischen Gelenkkonstrukts in den Knochen. Darstellung eines einseitigen Gelenkersatzes durch Einbau eines Knorpel-Knochen-Konstrukts ohne Bandverbindung in den Knochen.

Figur 1e) zeigt die Integration eines kompletten Gelenkersatzes mit Bandverbindung. Ein zweiteiliger Gelenkersatz wurde mit Bandverbindung in Knochen nach Entfernung des ursprünglichen Gelenks (hier Fingergrundgelenk) eingesetzt. Der biologische Gelenkersatz hat die korrekte anatomische Form.

Figur 1f) zeigt ein histologisches Schema nach Fusion der Knorpelkomponente mit dem Knochenträgermaterial. Das Trägermaterial der Knochenkomponente (hier Spongiosa) wurde während dem Verfestigungsvorgang der Knorpelzellsuspension (hier Fibrinkleber) in das Knorpelkonstrukt integriert. Es entsteht eine stabile Verbindung zwischen Knorpelschicht und Trägermaterial des Knochens.

Figur 1g) zeigt ein histologisches Schema eines Knorpel-Knochen-Konstrukts nach Synthese von Knochensubstanz durch Osteoblasten. Nach Besiedelung des in Figur 1f) gezeigten Konstrukts mit Osteoblasten wurde neue Knochensubstanz synthetisiert.

Figur 1h) zeigt ein histologisches Schema der Grenzfläche zwischen Knorpel und Knochen. Die Vergrößerung zeigt im Schema die Grenzfläche zwischen der Knorpel- und Knochenkomponente mit dem Trägermaterial des Knochens. Es zeigt sich die Verzahnung des Trägermaterials mit der neuen Knochensubstanz und die Vernetzung des Knorpels mit dem Knochen. Das Trägermaterial ist teilweise in die Knorpelkomponente integriert.

Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele näher erläutert, wobei Tierversuche die Durchführbarkeit der vorliegenden Erfindung belegen müssen, da Experimente am Menschen aus ethischen Gründen nicht vertretbar erscheinen.

#### **Beispiel 1: Isolierung von Chondroblasten**

Es wird zunächst die Isolierung von Chondroblasten aus Kaninchen beschrieben. Diese Methode ist im Prinzip auf Menschen übertragbar.

Das Kaninchen wird durch eine Injektion narkotisiert. Die Haare werden im Operationsgebiet rasiert, die Haut desinfiziert und steril abgedeckt. Über dem knorpeligen Anteil der Rippe wird ein Schnitt von ca. 2 cm gesetzt. Der Rippenanteil wird freipräpariert, etwa 1,5 cm Rippenknorpel einschließlich des Perichondrium werden herausgetrennt. Nach Blutstillung und Spülung wird die Wunde durch Rückstichnähte verschlossen. Anschließend wird ein Sprühverband angebracht.

Der autologe Rippenknorpel wird in sterile Ringerlösung (DAB 7-Lösung, erhältlich von Fa. Delta Pharma) gegeben, die mit 200 IU/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin supplementiert worden ist. Der Knorpel kann in der Lösung für einige Stunden bei 4°C aufbewahrt werden, muß aber innerhalb von 6-8 Stunden bearbeitet werden. Das Knorpelgewebe wird mit einem Skalpell (20/22) unter sterilen Bedingungen auf eine Größe von 1-2 mm zerkleinert und in eine große Petrischale (130 x 15 mm) gegeben. Die Knorpelmenge wird gewogen.

Anschließend werden 50 ml 2 mg/ml Kollagenase in HAM's F12-Medium (Hepes-Modifikation, mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in die Petrischale mit den Knorpelstückchen gegeben. Es folgt für 16-24 h Inkubation im Zellkultur-Brutschrank.

Die Knorpelzellsuspension mit verbliebenen Knorpelstückchen wird abpipettiert, mit dem gleichen Volumen HAM's F12-Medium (Hepes-Modifikation), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, ≈50 µg/ml Ascorbinsäure, ≈10% (v/v) autologes Serum, 2 mM Glutamin verdünnt und ausgiebig auf einem Schüttler gerüttelt, um die angedauten Knorpelstücke zu trennen. Dieser Schritt wird am besten in verschlossenen 50 ml-Zentrifugenschraubgefäßen durchgeführt.

Die Zellsuspension wird durch Zellfilter in 50 ml-Schraubgefäße filtriert (ca. 25 ml pro Gefäß) und mit o. g. HAM's F12-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen werden 3-4 mal mit 30 ml PBS durch Zentrifugation (10 min, 500 g, 21°C) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen in 30 ml Medium aufgenommen.

Um die Zellzahl zu bestimmen, werden zunächst 0,5 ml einer 0,4% Trypanblaulösung in ein Teströhrchen gegeben. Nach Hinzufügen von 0,3 ml HBSS (Hanks Salzlösung) und 0,2 ml Zellsuspension wird sorgfältig gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur



inkubiert. Anschließend wird durch Zählung mit einem Hämozytometer die Zellzahl ermittelt.

## Beispiel 2: Isolierung von Osteoblasten

Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, erstens die offene Knochenbiopsie (als Migrations- oder stromale Zellkultur) und zweitens die Aspiration von Knochenmark.

### a) Knochenmarkbiopsie

Nach örtlicher Betäubung und einem kleinen Hautschnitt wird eine sterile Knochenbiopsie durch einen Hohlbohrer entnommen. Es werden Spongiosablöckchen von 0,5 bis 1 cm<sup>3</sup> herausgebohrt. Anschließend wird die Wunde verschlossen. Alternativ dazu können auch 15 ml Knochenmark aspiriert werden. Die Spongiosa sollte sehr schnell weiterverarbeitet werden, wenn möglich nicht länger als 12 Stunden im Transportgefäß bei 4°C lagern. Das Medium wird verworfen, die Spongiosa in die Petrischale gegeben und dort in 2 bis 3 mm kleine Partikel ("Chips") zerkleinert.

### Migrationskultur:

Es werden 3 bis 4 Partikel in eine Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit 6 Vertiefungen verteilt und mit 3 ml Medium aufgefüllt, bzw. 6 bis 7 Partikel pro 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche mit 7 ml Medium. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zweimal pro Woche sollte das Medium gewechselt werden, dabei werden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop inspiziert. Nach 5 bis 9 Tagen sind erste Zellen zu erkennen, nach 10 bis 14 Tagen ein subkonfluenten Zellrasen mit 65 bis 75% Bodenflächenbedeckung.

### Stromale Zellkultur:

Zunächst wird der Knochen von Muskel- und Bindegewebsresten befreit. Mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette wird die Spongiosa in möglichst kleine Stückchen zerkleinert. Die Spongiosa-Fragmente können in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß gegeben und darin gewogen werden. Enthält das Material viel rotes Knochenmark, so kann man später pro 4 bis 6 g Spongiosa eine 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche beschicken. In das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß werden nun zur zerkleinerten Spongiosa circa 25 ml Medium 1 (Basalmedium mit Antibiotika, z.B. Medium 199, Fa. Gibco, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) gegeben und durch Vortexen (hochfrequentes Rütteln, circa 30 Sekunden, höchste Stufe) die Zellen herausgelöst. Der Überstand wird in andere Schraubgefäße überführt. Dieser Schritt wird so lange wiederholt, bis das Medium nach Vortexen nicht mehr trüb wird. Zuletzt kann noch eine Trypsin- (und/oder Kollagenase-)Behandlung (circa 10 Minuten, 37°C) durchgeführt werden, um weitere Zellen zu gewinnen. Die erhaltenen Zellsuspensionen werden 10 Minuten bei 250g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen, die Zellpellets in Medium resuspendiert und auf Kulturflaschen verteilt. Die gespülten Knochenstückchen können gegebenenfalls in einer separaten Kulturflasche zur Anzucht restlicher Zellen verwendet werden (nach Trypsinisierung sind diese aber gut mit Medium zu spülen).

Um die Zellzahl zu bestimmen werden nach der Resuspension der Zellpellets 50 µl der Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 46 µl Trypanblau gemischt. Durch Zugabe von 4 µl Essigsäure werden die Erythrocyten lysiert. Die kernhaltigen Zellen werden in einer Neubauer-Zellkammer ausgezählt. Anschließend werden etwa 10<sup>7</sup> Zellen der Zellsuspension pro 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche verteilt. Der Mediumwechsel erfolgt nach circa 5 Tagen, später zweimal pro Woche. Erste ahärente Zellen

sind am zweiten Tag erkennbar, Kolonien ab Tag 4 bis 5. Subkonfluenz wird zwischen Tag 9 und 11 erreicht.

b) Isolierung und Selektion der Knochenvorläuferzellen aus Knochenmarkaspirat

Nach örtlicher Betäubung wird eine sterile Knochenmarkpunktion durchgeführt. Durch Aspiration mit einer großvolumigen Kanüle und einer Heparin-benetzten Spritze werden etwa 15 bis 20 ml Blut aus dem hinteren Beckenkamm entnommen. Die Probe wird bei etwa 400 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 5 ml serumfreien Medium 1 suspendiert. Anschließend wird eine Dichtegradientenzentrifugation über einen 70%-Percollgradienten oder einem Ficoll-Kissen bei 400 g für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt, um die Roten Blutkörperchen von den Mesenchymalen Zellen zu trennen. Schließlich werden die Mesenchymzellen in einer Gewebekulturflasche ausplattiert und vermehrt.

Der osteoblastische Phänotyp der Zellen kann durch Nachweis der knochenspezifischen Proteine Alkalische Phosphatase und Osteocalcin im Kulturmedium oder durch immunhistochemische Färbungen von Kontrollkulturen nachgewiesen werden.

*Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität*

Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen. Pro Ansatz einer Gewebekulturschale mit sechs Vertiefungen werden 2 ml alkalische Phosphatase-Substratpuffer zugegeben (Rotipuran<sup>®</sup>, Fa. Roth, 50 mM Glycin, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM p-Nitrophenylphosphat, pH 10,5). Es wird 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit kann von 5 bis 20 Minuten variiert werden. Anschließend wird die inkubierte Pufferlösung in einer Küvette 1:1 mit 1 M NaOH gemischt. Schließlich wird die Absorption bei 405 nm bestimmt. Die Enzymaktivität wird angegeben als Absorption/Zellzahl.

### *Osteocalcinfärbung*

Nach Entfernung des Mediums werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit der Lösung A des FIX & PERM-Kit (Cell Permeabilisation Kit, Fa. AN DER GRUB, erhältlich von Fa. Dianova) für 15 Minuten fixiert, die Lösung wird anschließend abgesaugt. Lösung B des FIX & PERM-Kit wird zusammen mit dem Primärantikörper (rabbit anti human osteocalcin, Fa. PAESL + LOREI; 1:25 in PBS verdünnt) im Verhältnis 1:1 für 2,5 Stunden lichtgeschützt auf den Monolayer pipettiert, danach wird zwei- bis dreimal mit PBS gespült. Inkubation mit dem Sekundärantikörper (FITC - conjugated goat and rabbit IgG, Fa. Sigma, 1:80 in PBS) erfolgt lichtgeschützt für eine Stunde. Im Anschluß wird zwei- bis dreimal mit PBS gespült. Anschließend werden die Zellen sofort mit einem Immunfluoreszenzmikroskop mit eingestellter FITC-Anregung untersucht.

### *Alkalische Phosphatasefärbung*

Zur Färbung wurde ein Kit der Fa. Sigma Diagnostics, Katalog Nr. 86-R verwendet. Zunächst werden folgende Lösungen hergestellt: Die Fixierlösung entsteht durch Mischen von 65 ml Aceton, 25 ml "Citrate Solution" und 8 ml 37% Formaldehyd. Die Lösung ist in einer Glasflasche bei 4°C bis zu vier Wochen haltbar. Die "Diazonium Salt Solution" wird durch Mischen von jeweils 1 ml "FRV Alkaline Solution" und "Sodium Nitrite Solution", 2-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe des Gemisches zu 45 ml H<sub>2</sub>O hergestellt. Schließlich stellt man die "Alkaline Dye Mixture" durch Zugabe von 1 ml "Naphthol AS-BI Alkaline Solution" zu obiger "Diazonium Salt Solution" her (vor Licht schützen). Die Fixierlösung wird auf Raumtemperatur gebracht, dann werden die Zellen 30 Sekunden fixiert. Anschließend werden die Zellen 45 Sekunden mit H<sub>2</sub>O gespült, es ist darauf zu achten, daß die Zellen nicht austrocknen. In der Folge inkubiert man die Zellen 15 Minuten mit "Alkaline Dye

Mixture" bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wird 2 Minuten mit  $H_2O$  gespült. Die Gegenfärbung erfolgt mit "Hämatoxyline Solution". "Hämatoxyline Solution" wird aufgetropft und 2 Minuten auf den Zellen belassen, dann wird gut mit Wasser gespült. Die Zellen werden an der Luft getrocknet und können unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

### Beispiel 3: Isolierung von Fibroblasten

Ein Stück Hautgewebe wird von Fettgewebe befreit und in etwa  $0,5\text{ cm}^2$  große Stücke geschnitten. Die Hautstücke werden in  $2,5\text{ U/ml}$  Dispase entweder 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  oder 16 h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wird die Epidermis abgezogen und verworfen. Die Stücke werden mit einem Skalpell so gut wie möglich zerkleinert. Der entstehende Brei wird dann mit einer Enzymlösung, enthaltend ca.  $90\text{ U/ml}$  Kollagenase und ca.  $140\text{ U/ml}$  Hyaluronidase versetzt und 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt. Anschließend wird der Brei bei  $300\text{ g}$  für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Bodensatz in  $5\text{ ml}$  Medium 2 (Medium 1,  $10\%$  (v/v) Serum; bei therapeutischem Einsatz wird autologes, humanes Serum verwendet, bei Experimenten fötales Kälberserum, erhältlich von Fa. Gibco) aufgenommen und in eine  $25\text{ cm}^2$ -Gewebekulturflasche gegeben.

Sollten noch viele unverdaute Stücke vorhanden sein, wird der Bodensatz anstatt in Medium in  $5\text{ ml}$  ca.  $185\text{ U}$  Kollagenase/ml Pufferlösung aufgenommen, in eine  $25\text{ cm}^2$ -Kulturflasche gegeben und über Nacht in einem Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kollagenase-haltige Suspension abgenommen, zentrifugiert, der Bodensatz in Medium 2 aufgenommen und in dieselbe Flasche zurückgegeben.

#### Beispiel 4: Herstellung der Knorpelkomponente

##### a) Kollagenschwämme

Die Zellsuspension wird auf etwa  $3 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Kollagenvliese werden in etwa  $1 \times 1$  cm große Stückchen geschnitten (steril). Die Vliese werden mit einer Insulinspritze beimpft. Dabei reichen 2 ml Zellsuspension für 8 bis 10 Kollagenstückchen aus. Nach drei Stunden im Brutschrank werden die Stückchen auf eine Gewebekulturplatte mit sechs Vertiefungen verteilt und mit jeweils 8 ml Nährmedium aufgefüllt. Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt.

##### Tierversuch:

Primäre Rinder-Chondrozyten wurden als Suspension in Schwämme aus Rinder-Kollagen Typ 1 geimpft. Die Konstrukte wurden sieben Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank kultiviert und anschließend Nacktmäusen subkutan implantiert. Kontrollgruppen waren Kollagenschwämme ohne Zellen und Chondrozytensuspensionen ohne Trägermaterial. Die Explantation erfolgte nach drei, sechs und neun Wochen. Die Konstrukte wurden histologisch-immunhistochemisch untersucht. Die biomechanische Prüfung erfolgte durch einen "confined compression test" zur Bestimmung der hydraulischen Permeabilität und des Kompressionsmoduls (zyklische Komprimierung in einer Druckmaschine im Sinne eines Kompressions-Relaxationstests). Als Ergebnis zeigte sich morphologisch hyaliner Knorpel mit immunhistochemischem Nachweis von knorpeltypischem Kollagen Typ 2. In den Kontrollen wurde der leere Kollagenschwamm drei Wochen resorbiert. Die Zellsuspension entwickelte nur kleine Knorpelstücke. Die Steifigkeit der Konstrukte nahm im zeitlichen Verlauf zu (1,99 Mpa in Woche 9), war jedoch gegenüber nativem Knorpel (5,25 Mpa) verringert. Die hydraulische Permeabilität zeigte signifikant höhere Werte als die Kontrolle ( $2,69 \times 10^{-14}$  gegenüber  $3,0 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ ).

### b) Fibrinsuspension

Die Knorpelzellen werden gelöst und nach Zentrifugation in der Thrombinkomponente eines Zweikomponentenfibrinklebers in einer Dichte von  $2-3 \times 10^7$  Zellen/ml eingebracht. Anschließend wird durch synchrones Spritzen mittels einer Doppelspritze die zellhaltige Thrombin- mit der Fibrinogenkomponente vermischt und in eine vorgefertigte Kulturform gegossen. Es entsteht durch Präzipitation des Fibrinogen zu Fibrin ein fester "Clot". Schließlich wird mit HAM's F12-Medium (Hepes-Modifikation) überschichtet und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### Tierversuch:

Primäre Chondrozytenkulturen werden aus Rippenknorpelbiopsien etabliert und mit einer Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert. Anschließend wird durch eine Doppelspritze die Fibrinogenkomponente mit der chondroblastenhaltigen Thrombinkomponente (4 IE Thrombin/ml) zusammengebracht und in eine strukturierte, anatomisch angepaßte Form gegossen. Der Fibrinkleber verfestigt sich in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration innerhalb von 5-10 Minuten in der gewünschten Form.

#### Tierversuch:

Die Konstrukte wurden Nacktmäusen subkutan implantiert. Kontrollgruppen wurden "Fibrinclots" ohne Zellen und Chondrozytensuspensionen ohne Fibrin implantiert. Die Explantation erfolgte nach drei, sechs und neun Wochen. Die Konstrukte wurden histologisch-immunhistochemisch untersucht. Die biomechanische Prüfung erfolgt durch einen "confined compression test" zur Bestimmung der hydraulischen Permeabilität und des Kompressionsmoduls.

Als Ergebnis fanden sich in der Gruppe mit Knorpelzellen in Fibrinkleber mikroskopisch neu gebildetes Knorpelgewebe, in den Kontrollgruppen war kein Knorpelgewebe zu finden. Histologisch zeigten die Knorpelkonstrukte die Morphologie von hyalinem Knorpel mit immunhistochemischem Nachweis von Kollagen Typ 2. Die Knorpelkonstrukte zeigten bei der biomechanischen Prüfung im "confined compression test" eine Steifigkeit (Kompressionsmodul) von 0,59 Mpa und eine hydraulische Permeabilität von  $1,03 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{Ns}$ .

### Beispiel 5: Herstellung der Knochenkomponente

#### a) Herstellung der Zell-Biomaterialkonstrukte

Die Trägermaterialien werden eine Woche vor Besiedelung mit Zellen in Kulturmedium gewässert, um eine Rehydrierung und pH-Stabilität zu erreichen.

Durch Trypsinisierung werden die als Monolayerkultur gezüchteten Zellen aus der Kulturschale abgelöst und nach Zentrifugation und Zählung in einem geringen Volumen als Einzelzellsuspension suspendiert. Das Medium wird abgenommen, ein Teil in ein 1,8 ml-Kryoröhrchen abgefüllt und eingefroren, der Rest wird verworfen. Aus den Überständen wird mittels eines ELISA Osteocalcin und alkalische Phosphatase bestimmt. In einer Gewebekulturplatte mit sechs Vertiefungen wird mit 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37°C; 0,025% Trypsin) pro Vertiefung das restliche Medium abgespült. Anschließend werden mit 1 ml Trypsin/EDTA pro Vertiefung die Zellen vom Boden gelöst. Das Trypsin sollte nicht länger als fünf bis acht Minuten auf den Zellen verbleiben, um irreversible Schädigung zu vermeiden. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst haben, wird mit 1 ml serumhaltigem Kulturmedium 2 neutralisiert (vorgewärmt). Die Zellsuspension wird in einem Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß gesammelt und bei ca. 300g und 4°C für 10



Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml suspendiert und ausgezählt.

Die Zellsuspension wird in einer Aspirationskammer in die dreidimensionalen Trägermaterialien durch Unterdruck ohne Volumenverlust eingezipen, so daß die gesamte innere Oberfläche besiedelt wird.

#### b) Ex vivo-Züchtung der Konstrukte

Die Zell-Biomaterialkonstrukte werden in eine spezielle sterile Perfusionskammer gebracht und eingespannt, so daß ein unidirektioneller Durchfluß des Kulturmediums gewährleistet ist. Neben der Zufuhr von immer frischem Medium werden die Zellen durch den Flüssigkeitsstrom mechanisch stimuliert. Das Kulturmedium (Osteoblastenmedium, z.B. BGJ-B-Medium, Fa. Gibco, mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% (v/v) Serum; bei therapeutischem Einsatz wird autologes, humanes Serum verwendet, bei Experimenten fötales Kälberserum) wird durch Zusatz von  $10^{-8}$  mM Dexamethason, 50 µg/ml Vitamin C und 40 ng/ml Vitamin D3 im zuführenden Teil angereichert, um die Zellen zur Matrixsynthese zu stimulieren.

#### c) Analyse der Konstrukte in der Kulturphase

Zur Messung des Zellmetabolismus wird den Konstrukten ein Tetrazoliumssalz "XTT" zugesetzt. Der Test beruht auf der kolorimetrischen Biotransformation des Salzes zu dem intensiv gelb gefärbten Formazan in den Mitochondrien. Die Formazankonzentration wird zu bestimmten Zeitpunkten nach der Zugabe der Lösung photometrisch bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Das Ergebnis korreliert mit dem Zellmetabolismus bzw. der Proliferation der Zellen (Cell Proliferation Kit, Firma Roche Diagnostics, Mannheim).

Die Adhäsion kann durch "Environmental Scanning Electron Microscopy" (ESEM) kontrolliert werden. 48 Stunden nach Besiedelung der Biomaterialien werden die Konstrukte mit 4 % Formaldehyd fixiert, auf einen Träger geklebt und in eine ESEM-Kammer (Freiburger Materialforschungsinstitut) gebracht. Hiermit kann in der Vergrößerung eines Elektronenmikroskopes die Anhaftung der Zellen auf der Materialoberfläche dargestellt werden.

#### d) Analyse der Konstrukte am Ende der Kulturphase

Nach zwei bis vier Wochen in der Perfusionskammer werden die Konstrukte fixiert und durch die klassische HE-Färbung histologisch auf eine neue Matrixbildung auf den Trägermaterialien untersucht. Durch die spezielle Richardson-Levaletzko-Färbung wird neues Knochengewebe intensiv blau angefärbt.

Durch Immunhistochemie wird Kollagen 1 als organischer Hauptbestandteil des Knochengewebes nachgewiesen (z.B. durch die Avidin-Biotin-Methode).

Durch Immunfluoreszenz mit FITC-markierten Antikörpern wird Osteocalcin als spezifischer Knochenmarker in dem neuen Gewebe dargestellt.

#### **Beispiel 6: Herstellung von Bandkomponenten**

Fibroblasten werden als Suspension mit  $1 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^7$  Zellen/ml Medium auf bandförmige Materialien geimpft und in DMEM-Medium mit 10 % autologem Serum bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten.

### Beispiel 7: Fusion der Einzelkomponenten

Primäre Chondrozytenkulturen wurden aus Rippenknorpelbiopsien etabliert und mit einer Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert. Anschließend wird durch eine Doppelspritze die Fibrinogenkomponente mit der chondroblastenhaltigen Thrombinkomponente zusammengebracht und in eine strukturierte, anatomisch angepaßte Form gegossen. Der Fibrinkleber verfestigt sich in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration innerhalb von 5-10 Minuten in der gewünschten Form. Parallel werden primäre Osteoblastenkulturen aus Beckenkamm-Biopsien (siehe Beispiel 2) hergestellt und der osteoblastische Phänotyp durch Alkalische Phosphatase und Osteocalcin nachgewiesen. Die Zellen werden auf dreidimensionalen, porösen Biomaterialien (z.B. bovine oder humane Spongiosa) als Suspension mit  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml viskösem Gel oder flüssigem Medium durch Vakuumaspiration aufgebracht. Die Adhäsion der Zellen wird durch Elektronenmikroskopie und die Proliferation durch XTT-Stoffwechseltests kontrolliert. Die einzelnen Konstrukte werden getrennt für drei Tage in vitro bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Im Anschluß erfolgt die Fusion der Knochen- und Knorpelkomponente durch Fibrinklebung.

Die Fusion kann auch abgewandelt wie folgt erreicht werden: Während des Prozesses der Herstellung der Knorpelkomponente und der Abbindung des Fibrinklebers wird das leere, vorgeformte und angepaßte Knochenträgermaterial leicht in die Knorpelschicht eingedrückt, so daß es fest eingebunden wird.

Im zweiten Schritt erfolgt dann die Besiedelung der Knochenkomponente durch die Osteoblastensuspension in einem viskösem Gel oder flüssigem Medium.

Als Ergebnis eines derartigen Versuchs waren Knorpel- und Knochenkomponente fest miteinander fusioniert. Die

Knorpelfläche war glatt und war deutlich von der Knochenkomponente abgrenzbar. Makroskopisch bestand eine korrekte, stabile anatomische Gelenkform entsprechend den natürlichen anatomischen Gegebenheiten.

#### Knorpel-Knochenkonstrukte mit Bandapparat:

Die oben beschriebenen Knorpel-Knochenkonstrukte werden mit Bandkonstrukten verbunden, indem ein 0,5 mm großer Bohrkanal durch die Knochenkomponente gebohrt wird und das Bandkonstrukt, bestehend aus Fibroblasten auf einem Kollagenband, hindurchgezogen wird.

Das Bandkonstrukt ist fest integriert und kann zwei Knorpel-Knochenkonstrukte so verbinden und halten, daß die Knorpelflächen artikulieren und sich gegeneinander bewegen können.

#### Tierversuche:

Ca. sechs bis acht Wochen alte Nacktmäuse wurden in einer Narkosekammer mit einem Isofluran<sup>®</sup>-Sauerstoffgemisch (3 % Isofluran<sup>®</sup> in 100 % O<sub>2</sub>, Fluß 4 l/min.) betäubt. Unter Aufrechterhaltung der Narkose mit einer Inhalationsmaske (1,5 - 2 % (v/v) Isofluran<sup>®</sup> in 100 % O<sub>2</sub>, Fluß 0,5 bis 1 l/min.) wurden die Tiere mit Betaisodona<sup>®</sup> abgewaschen und das Operationsgebiet steril abgedeckt. Es erfolgte ein ca. 2 cm langer, längs verlaufender Hautschnitt im Bereich des Rückens, Spreizen mit der Präparationsschere und Schaffen einer Hauttasche. Das osteochondrale Transplantat (ca. 2 x 0,5 x 0,5 cm) wurde eingelegt und die Wunde mit Einzelknopfnähten verschlossen. Ein steriler Wundverband wurde angelegt. Der Eingriff dauerte etwa 15 Minuten. Die Wunden der Tiere wurden bis zur gesicherten Wundheilung täglich kontrolliert.

Die Nacktmäuse erhielten schließlich eine letale Dosis CO<sub>2</sub> per inhalationem am 21., 42. bzw. 63. Tag postoperativ. Die osteochondralen Konstrukte wurden mit dem umgebenden Gewebe herauspräpariert und danach histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet. Als Ergebnis waren in den fusionierten osteochondralen Konstrukten die Knorpel- und Knochenkomponente fest miteinander verbunden. Histologisch zeigte die Knorpelschicht die Morphologie von hyalinem Knorpelgewebe mit immunhistochemischem Nachweis von Kollagen Typ 2. In der Knochenkomponente fand sich nach acht Wochen ein appositionelles Knochenwachstum mit eingesproßten Kapillaren. Die Knorpelkomponente zeigte bei der biomechanischen Prüfung im "confined compression test" eine Steifigkeit (Kompressionsmodul) von 0,59 Mpa und eine hydraulische Permeabilität von  $1,03 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{Ns}$ .

#### Beispiel 8: Lipofektion von Osteoblasten mit EGF-Plasmid

Humane Osteoblasten werden am Tag vor der Transfektion auf Gewebekulturbedälter verteilt. Dabei wurden Gewebekulturschalen mit 6 Vertiefungen (Fa. Costar, Kat. Nr. 3506, 9,6 cm<sup>2</sup> pro Vertiefung), im folgenden "6-well-Platten" genannt, und Zellkultureinsätze (Falcon Cell Culture Insert, Fa. Becton Dickinson, PET-Membran mit  $1,6 \times 10^6$  Poren (1 µm) pro cm<sup>2</sup>, Kat. Nr. 3102, 4,2 cm<sup>2</sup> Fläche) verwendet.

Es folgen zwei Protokolle, mit denen hohe Expressionen erreicht werden.

##### a) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in 6-well-Platten

Zur Herstellung der Transfektionslösung werden pro Ansatz 230 µl Medium 1 ohne Zusätze, 15 µl Escort<sup>®</sup>-Reagens (Fa. Sigma) und 6 µg Plasmid-DNA (enthaltend das Gen für humanes EGF) gemischt.

Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird der Lösung pro Ansatz 2 ml Medium 2 hinzugefügt. Das Kulturmedium wird von den Zellen entfernt und das Transfektionsgemisch wird zu den Zellen gegeben (2,25 ml/Vertiefung). Danach werden die Zellen 12 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Das Transfektionsgemisch wird von den Zellen entfernt, die dann mit Medium 2 gewaschen werden. Schließlich wird zur Weiterkultivierung ca. 3 ml Vollmedium in jede Vertiefung gegeben. Das Medium wird täglich gewechselt, von den Überständen werden Proben bei -20°C aufbewahrt, die dann zur Bestimmung des EGF-Gehalts verwendet werden. Die EGF-Konzentration wurde durch einen ELISA bestimmt (Quantikine<sup>TM</sup>, R&D Systems, Kat. Nr. DEG-00). Hierzu müssen die Proben gegebenenfalls vorher 1:10-1:15 in Medium verdünnt werden, da der Meßbereich des ELISA 0-250 pg/ml beträgt.

Die Analyse ergab, daß EGF über 10 Tage mit einem Maximum am 5. Tag sezerniert wurde.

b) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in Zellkultureinsätzen ("Trennkammerversuch")

Bei den Zellkultureinsätzen handelt es sich um Einsätze, die eine poröse Membran aufweisen, an die die Zellen adhärieren können. Der Einsatz wird in eine Gewebekulturplatte mit (meist 6) Vertiefungen eingesetzt, so daß die "apikalen" Zellen in dem Einsatz ca. 3 mm von den "basalen" Zellen in der Vertiefung der Kulturschale räumlich getrennt sind, aber per diffusionem Signalstoffe über die permeable Membran austauschen können. Medium wird zur "basalen" und "apikalen" Seite der Zellen gegeben, also in die Vertiefung der Zellkulturschale, in die der Einsatz eingesetzt ist und in den Einsatz selbst. Diese Anordnung kann benutzt werden, um einen parakrinen Effekt sezernierter Wachstumsfaktoren auf andere Zellen zu bestimmen. Dazu werden in den Zellkultureinsatz Osteoblasten ausgesät, die transfiziert werden. Nach der Transfektion werden die Einsätze

in Platten transferiert, die mit nicht-transfizierten Zellen besät sind. Da das Medium und Faktoren, die von den transfizierten Zellen ausgeschieden werden, durch den Filter passieren können, kann durch Zellzahl-Bestimmung der nicht-transfizierten Zellen im anderen Kompartiment eine verstärkte Proliferation nachgewiesen werden.

Die Transfektionslösung wird wie in a) hergestellt. Das Kulturmedium wird aus der Vertiefung der Kulturplatte und aus dem Einsatz möglichst vollständig entfernt. In jeden Einsatz werden 2,25 ml Transfektionslösung gegeben. Nach 30-60 min Inkubation im Brutschrank wird 1 ml Vollmedium zugegeben. Falls während der Inkubationsphase die Transfektionslösung rasch durch den Filter des Einsatzes läuft, muß gegebenenfalls früher Medium zugegeben werden. Anschließend wird 12 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Transfektionslösung wird abgesaugt, der Einsatz wird ausgiebig mit Medium gewaschen. Der Einsatz kann nun in eine Kulturschale mit Zellen überführt werden. Das Mediumvolumen beträgt insgesamt 4 ml/Vertiefung und Einsatz.

In einem Versuch wurden 10 mit Osteoblasten besäte Einsätze mit EGF-Plasmid transfiziert. Als Kontrollen wurden 10 Inserts mit Zellen nur mit Liposomenlösung ohne Plasmid behandelt, weitere 6 Einsätze wurden völlig unbehandelt gelassen, weitere 6 Einsätze wurden mit EGF-Plasmid transfiziert, nach der Transfektion wurde aber täglich 11,9 µg/ml Medium neutralisierender anti-EGF-Antikörper zugegeben (Fa. R&D, No. AB-236-NA, 1 mg/ml in PBS, pH 7,4, steril). Am Tag 6 nach der Transfektion wurde die Zellzahl der nicht-transfizierten Zellen im unteren Kompartiment durch Zellzählung mit einem "Casy TT"-Zellzähler bestimmt. Das Ergebnis ist in Figur 2 gezeigt. Beide Kontrollansätze ("Liposom" und "unbehandelt") zeigen signifikant niedrigere Zellzahlen als der Ansatz, in dem EGF-Plasmid transfiziert wurde ("EGF/Liposom"). Das zeigt, daß die transfizierten Zellen einen proliferativen Effekt haben. Die dritte Kontrolle ("Antikörper") zeigt wiederum niedrigere

Zellzahlen als der Ansatz mit transfizierten Zellen, aber ohne Antikörper ("EGF/Liposom"). Das beweist, daß der proliferative Effekt auf EGF zurückzuführen ist. Dieses Experiment zeigt, daß durch transiente Lipofektion von Osteoblasten Zellen erzeugt werden können, die Wachstumsfaktoren sezernieren, die das Wachstum anderer Zellen stimulieren können.

In einem weiteren "Trennkammerversuch" wurde der proliferative Effekt EGF-transfizierter Osteoblasten mit dem proliferativen Effekt von rekombinantem, humanem EGF verglichen, das den Zellen täglich zugesetzt wurde. Am Tag 4 nach Transfektion wurde die Zellzahl der verschiedenen Ansätze bestimmt. Das geschah durch automatische Zellzählung mittels "Casy TT" und durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer. Das Ergebnis ist in Figur 3 gezeigt. Nach Transfektion mit EGF-DNA ("EGF-Transfektion") ist die Zellzahl des Transfektionsansatzes fast doppelt so hoch wie die des nicht transfizierten Kontrollansatzes ("Kontrolle"). Zugegebenes rekombinantes EGF (1 ng/ml jeden Tag) bewirkt zwar auch verstärktes Wachstum ("rhEGF-Zugabe"), jedoch nicht so stark wie es durch die Transfektion erreicht wird.

#### Beispiel 9: Lipofektion von Osteoblasten mit hbFGF-Plasmid

Osteoblasten werden mit einem Plasmid transfiziert, das eine Nucleinsäure enthält, die für humanen "basic fibroblast growth factor" (hbFGF) codiert.

Am Vortag der Transfektion werden die Zellen auf betreffende Kulturbehälter verteilt (z. B. 6-well-Platten oder Zellkultureinsätze für den Trennkammerversuch). Eingesetzt werden je 40000 Zellen pro Vertiefung der 6-well-Platte (9,6 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche pro Vertiefung) oder pro Zellkultureinsatz (4,2 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche pro Einsatz). Es folgen zwei



Protokolle, mit denen eine hohe Expression der transfizierten Gene erzielt wurde.

a) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in 6-well-Platten (Escort<sup>TM</sup>-Reagens)

Die Transfektionslösung wird durch Mischen von 115 µl Medium 1, 9 µl Escort<sup>TM</sup>-Reagens (Fa. Sigma) und 3 µg hbFGF-Plasmid pro Ansatz hergestellt. Alternativ können auch 115 µl Medium 1, 15 µl Escort<sup>TM</sup>-Reagens und 5 µg Plasmid gemischt werden. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird das Kulturmedium von den Zellen entfernt, statt dessen wird 1 ml Medium mit Zusätzen zu den Zellen gegeben, gefolgt von der Transfektionslösung. Anschließend wird 1-2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es folgt Zugabe von 2 ml Medium/Vertiefung und 24 h Inkubation bei 7°C und 5% CO<sub>2</sub>. Weiterhin wird das Medium täglich gewechselt, wobei Proben des Kulturüberstandes bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt werden. Die bFGF-Konzentration in den Proben wird durch ELISA bestimmt. Das Ergebnis ist in Figur 4 gezeigt. Bei Verwendung von 3 µg DNA und 9 µl Escort<sup>TM</sup> ist die FGF-Sekretion am Tag 3 nach der Transfektion am höchsten, bei Verwendung von 5 µg DNA und 15 µl Escort<sup>TM</sup> am Tag 5 nach der Transfektion. Die ins Medium abgegebene FGF-Menge ist bei Transfektion mit 5 µg DNA höher.

b) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in 6-well-Platten (Fugene<sup>®</sup>-Reagens)

Die Transfektionslösung wird durch Mischen von Medium ohne Zusätze, Fugene<sup>®</sup>-Reagens (Fa. Roche Diagnostics) und DNA hergestellt. Es wurden 3 Varianten getestet:

Ansatz:	A	B	C
$\mu$ l Medium ohne Zusätze:	97	94	91
$\mu$ l Fugene <sup>®</sup> -Reagens:	3	6	9
$\mu$ g hbFGF-Plasmid:	3	3	3

Dabei werden jeweils das Medium und das Fugene<sup>®</sup>-Reagens zuerst gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die DNA zugegeben, nach Mischen wird weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wird von den Zellen entfernt, dann werden pro Vertiefung 3 ml Medium und danach die Transfektionslösung zugegeben. Es folgt eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Im Folgenden wird täglich das Medium gewechselt, wobei wiederum Proben des Kulturüberstandes bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden. Die FGF-Konzentration im Medium wird durch ELISA bestimmt. Auch bei Verwendung des Fugene-Reagens kann die DNA-Menge variiert werden. Es wurden 3 und 5  $\mu$ g Plasmid getestet. Das Ergebnis ist in Figur 5 gezeigt. Am Tag 7 nach der Transfektion wird bei Einsatz von 3  $\mu$ g DNA mehr FGF sezerniert als bei Einsatz von 5  $\mu$ g DNA ("3  $\mu$ g Plasmid/Fugene<sup>®</sup>" und "5  $\mu$ g Plasmid/Fugene<sup>®</sup>"). Als Kontrolle wurde auch nur DNA ohne Fugene<sup>®</sup>-Reagens "transfiziert". Die gemessene FGF-Menge ist deutlich niedriger als bei Verwendung von Fugene<sup>®</sup> ("3  $\mu$ g Plasmid" und "5  $\mu$ g Plasmid"). Als weitere Kontrolle wurde die FGF-Konzentration im Medium von völlig unbehandelten Zellen ermittelt ("unbeh. Zellen").

Das Ergebnis zeigt, daß Osteoblasten erfolgreich mit hbFGF-DNA transfiziert werden können und daß daraufhin mehr FGF ans Medium abgegeben wird.

- c) Transfektion subkonfluenten Monolayerkulturen in Zellkultureinsätzen ("Trennkammerversuch")

Die Transfektionslösung wird durch Mischen von 115  $\mu$ l Medium ohne Zusätze, 15  $\mu$ l Escort<sup>®</sup>-Reagens und 5  $\mu$ g hbFGF-Plasmid hergestellt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wird 2 ml Medium 2 zugegeben. Das Kulturmedium wird aus dem Zellkultureinsatz, in dem die zu transfizierenden Zellen sind, und aus der Vertiefung der 6-well-Platte, in der sich der Einsatz befindet, möglichst vollständig entfernt. Pro Einsatz werden 2,25 ml Transfektionslösung zu den Zellen gegeben. Es wird 30-60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird 1 ml Vollmedium pro Einsatz zugegeben (gegebenenfalls muß früher Medium zugegeben werden, falls die Transfektionslösung schnell durch den Filter des Einsatzes läuft). Es wird nochmals 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Danach wird die Transfektionslösung abgesaugt, der Einsatz wird ausgiebig mit Medium gewaschen. Der Einsatz wird nun in eine Kulturschale mit nicht-transfizierten Zellen eingesetzt, deren Proliferation überwacht wird. Das Medium-Volumen von Einsatz und Kulturschale zusammen beträgt 4 ml.

An Tag 4 nach der Transfektion wurde in einem solchen Versuch die Zellzahl der nicht-transfizierten Zellen in den unteren Kompartimenten bestimmt. Figur 6 zeigt das Ergebnis. Die Kontrolle zeigt die natürliche Vermehrung von Zellen in 4 Tagen ("unbeh. Zellen"). Sowohl die Anwesenheit hbFGF-transfizierter Zellen ("5  $\mu$ g Plasmid/15  $\mu$ l Escort<sup>TM</sup>") als auch Zugabe von rekombinantem humanem bFGF ("rek. bFGF 4 ng/ml") führen im Vergleich mit der Kontrolle zu erhöhter Proliferation der Zellen. Das zeigt, daß die transfizierten Zellen durch FGF-Sekretion parakrin das Wachstum nicht-transfizierter Zellen stimulieren können.

#### Beispiel 10: Lipofektion von Osteoblasten mit hVEGF-Plasmid

Subkonfluente Osteoblasten werden mit DNA transfiziert, die für humanen "vascular endothelial growth factor" (hVEGF) codiert.

Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen auf betreffende Kulturbedälter verteilt. Bei Verwendung von 6-well-Platten werden 50000 Zellen pro Vertiefung eingesetzt.

Die Transfektionslösung wird durch Mischen von Medium ohne Zusätze, Fugene<sup>®</sup>-Reagens (Fa. Roche Diagnostics) und DNA hergestellt. Es wurden 4 Varianten getestet:

Ansatz:	A	B	C	D
µl Medium ohne Zusätze:	94	91	90	85
µl Fugene-Reagens:	6	9	10	15
µg hVEGF-Plasmid:	3	3	5	5

Dabei werden jeweils das Medium und das Fugene-Reagens zuerst gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die DNA zugegeben, nach Mischen wird weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wird von den Zellen entfernt, dann werden pro Vertiefung 3 ml Medium und danach die Transfektionslösung zugegeben. Es folgt eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Im Folgenden wird täglich das Medium gewechselt, wobei wiederum Proben des Kulturüberstandes bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden. Die VEGF-Konzentration im Medium wird durch ELISA bestimmt. Das Ergebnis der oben genannten Ansätze ist in Figur 7 gezeigt. Am Tag 7 nach der Transfektion wurde die VEGF-Konzentration bestimmt. Die 4 Ansätze ("A" bis "D") zeigen gegenüber der Kontrolle, die die VEGF-Konzentration im Medium von unbehandelten Zellen zeigt ("unbeh. Zellen"), erhöhte VEGF-Werte. Die Werte sind auch höher als bei Ansätzen, in denen die Zellen nur mit Plasmid, aber ohne Fugene-Reagens behandelt wurden ("5 µg Plasmid").

### Beispiel 11: Elektroporation von Osteoblasten mit EGF-Plasmid

Osteoblasten in Kultur werden durch Trypsinierung abgelöst, zentrifugiert und gezählt. Die Zellsuspension wird auf  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 300 µl dieser Suspension werden in eine Elektroporationsküvette (Gene Pulser<sup>®</sup>/E.coli Pulser<sup>™</sup> Cuvette, Cat. No. 165-2086, 0,2 cm gap electrode, Fa. BioRad, CA 94547) überführt. 30 µg DNA (hEGF-Plasmid) werden zu den Zellen in die Küvette gegeben. Eine parallel vorbereitete Kontrollküvette mit Zellen erhält keine DNA. Anschließend werden die Küvetten 10 min auf Eis inkubiert.

Die eigentliche Elektroporation wird mit einem "Gene Pulser II System" der Fa. BioRad durchgeführt (Cat. No. der main unit: 165-2105). Die Einstellungen sind 150 oder 250 V und 960 µF; die Elektroporationszeit wird von dem Gerät automatisch bestimmt, sie beträgt etwa 4 Sekunden. Die Küvette wird in die Halterung der "shocking chamber" eingespannt, wo die Elektroporation stattfindet. Nach der Elektroporation wird die Küvette aus der Halterung entnommen und 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden in Medium (Osteoblastenmedium, z.B. BGJ-B-Medium, Fa. Gibco, mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% (v/v) Serum; bei therapeutischem Einsatz wird autologes, humanes Serum verwendet, bei Experimenten fötales Kälberserum) resuspendiert und auf Gewebekulturschalen verteilt. Das Medium wird täglich gewechselt (Nachweis von EGF "nicht-kumulativ"). Alternativ kann das Medium nicht gewechselt werden (Nachweis von EGF "kumulativ"). In einem "nicht-kumulativen" Experiment wurden von den 4 ml Kulturüberstand täglich Proben entnommen, die bei -20°C aufbewahrt wurden, bis durch ELISA die EGF-Konzentration bestimmt wurde. Es wurden aber  $1,25 \cdot 10^6$  humane Osteoblasten elektroporiert (250 V, 960 µF; 3,9 s, 20 µg DNA). Das Ergebnis ist in Figur 8 dargestellt. Die gemessene EGF-Konzentration ist in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen aufgetragen. Die EGF-Sekretion ins Medium hat am Tag 2 nach Transfektion ein

Maximum. EGF-Expression ist mehr als eine Woche lang nachweisbar.

Universitätsklinikum Freiburg

Biologischer Gelenkersatz

### Patentansprüche

1. Biologisches, zumindest teilweise in vitro hergestelltes Gelenkkonstrukt, das wenigstens folgende Bestandteile umfaßt:

- a) wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial;
- b) Knorpelgewebe enthaltend Chondrocyten und/oder Chondroblasten und Knorpelsubstanz;
- c) Knochengewebe enthaltend Osteoblasten und/oder Osteocyten und Knochensubstanz;

wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind.

2. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Gelenkseite aufweist, die Kontakt zu einem anderen Gelenkteil haben kann und deren Oberfläche aus Knorpelgewebe besteht, und eine Ankerseite, die zur Verankerung des Gelenkkonstrukts im Knochenschaft dienen kann und die aus Knochengewebe besteht.

3. Biologisches Gelenkkonstrukt nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Ankerseite wenigstens einen zylinderförmigen Zapfen aufweist, der mit einem Knochenschaft verbunden werden kann.

4. Biologisches Gelenkkonstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich wenigstens eine

Bandkomponente umfaßt, die zwei Gelenkteile funktionell miteinander verbinden kann

5. Biologischer Gelenkersatz, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Gelenkkonstrukte nach einem der Ansprüche 2-4 mit ihren Gelenkseiten Kontakt zueinander haben und mit ihren Ankerseiten in 2 verschiedenen Knochenschäften verankert werden können.

6. Biologischer Gelenkersatz nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Gelenkkonstrukte durch wenigstens 2 Bandkomponenten verbunden sind.

7. Biologischer Gelenkersatz nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Gelenkkapsel aufweist.

8. Verfahren zur Herstellung eines biologischen Gelenkkonstruktes, das folgende Schritte umfaßt:

a) Bereitstellung einer Knochenkomponente durch Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials mit Osteoblasten;

b) Bereitstellung einer Knorpelkomponente durch Herstellung einer Suspension von Chondrocyten in einem Medium oder Gel oder durch Besiedelung einer bioverträglichen Trägersubstanz mit Chondrocyten;

c) Verbindung der Knochen- und der Knorpelkomponente, so daß das Trägermaterial in den Knorpel integriert wird;

d) Züchtung des Konstruktes in vitro, wobei durch Stimulation der Zellen zur Anheftung und zur Synthese ihrer gewebespezifischen extrazellulären Matrix eine biologische Vernetzung der zusammengesetzten Komponenten erreicht wird;



9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial der Knochenkomponente (a) so geformt wird, daß es eine Gelenkseite zur Aufnahme einer Knorpelfläche und eine Ankerseite zur Verbindung mit einem Knochen aufweist.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bereitstellung der Knorpelkomponente (b)

aa) Chondrocyten in der Thrombinkomponente eines Fibrinklebers suspendiert werden,

bb) diese Suspension mit der Fibrinogenkomponente des Fibrinklebers gemischt wird,

cc) die Mischung in eine anatomisch gewünschte Form gebracht wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Knochen- (a) und die Knorpelkomponente (b) vor der Verbindung getrennt in vitro kultiviert werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung (c) von Knochen- und Knorpelkomponente mittels Fibrinklebung erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß während der Verfestigung des Fibrinklebers bei der Herstellung der Knorpelkomponente das noch nicht durch Osteoblasten besiedelte Trägermaterial der Knochenkomponente in die Knorpelschicht gedrückt wird, so daß es fest eingebunden wird und,

daß später die Besiedelung der Knochenkomponente durch Osteoblasten erfolgt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-13, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin die Herstellung einer

Bandkomponente aus faserartigen Materialien und Fibroblasten umfaßt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-14, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin die Herstellung einer Kapselkomponente aus faserartigen, membranösen Materialien und Fibroblasten umfaßt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-15, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial der Knochenkomponente nach der Formgebung wenigstens eine Bandverbindungsstelle zur Anbringung von Gelenkbändern aufweist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-16, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial der Knochenkomponente wenigstens ein Kapselverbindungsareal zur Anbringung einer Gelenkkapsel aufweist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-17, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Bandkomponente an einer Bandverbindungsstelle der Knochenkomponente gemäß Anspruch 11 angebracht wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-18, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine Kapselkomponente an einem Kapselverbindungsareal der Knochenkomponente gemäß Anspruch 12 angebracht wird.

20. Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe, dadurch gekennzeichnet, daß Spongiosa als Trägermaterial verwendet wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß autoklavierte, humane, allogene Spongiosa als Trägermaterial verwendet wird.

22. Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Isolierung von Knochenzellen oder Knochenvorläuferzellen;
- b) Transfektion der Zellen durch nicht-viralen Gentransfer mit wenigstens einem Gen, das für einen Wachstumsfaktor codiert;
- c) Besiedelung eines bioverträglichen Trägermaterials mit den transfizierten Zellen;
- d) Züchtung der Zell-Trägermaterial-Konstrukte in vitro.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Zellen vor der Transfektion vermehrt werden.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch Lipofektion erfolgt.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-24, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion transient ist.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-25, dadurch gekennzeichnet, daß das transfizierte Gen oder wenigstens eines der transfizierten Gene für einen Wachstumsfaktor codiert, der aus folgender Gruppe ausgewählt ist: EGF, bFGF, VEGF, BMP-1 bis BMP-20, TGF- $\beta$ , PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-26, dadurch gekennzeichnet, daß das bioverträgliche Trägermaterial auch mit nicht transfizierten Zellen besiedelt wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-27, dadurch gekennzeichnet, daß die isolierten Zellen stromale Zellen sind.

29. Knochengewebe, enthaltend folgende Bestandteile:

a) Osteoblasten, die in vitro durch nicht-viralen Gentransfer mit einem Gen, das für einen Wachstumsfaktor codiert, transfiziert worden sind;

b) wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial

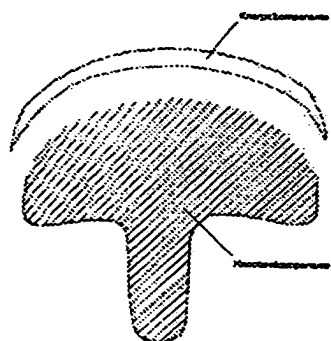
30. Knochengewebe nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß es nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22-28 erhalten werden kann.

31. Verwendung von Knochengewebe gemäß Anspruch 30 bei einem Verfahren zur Herstellung eines biologischen Gelenkkonstrukts gemäß einem der Ansprüche 8 bis 21.

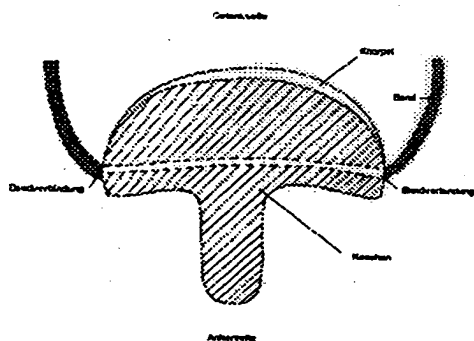
Universitätsklinikum Freiburg

### **Zusammenfassung**

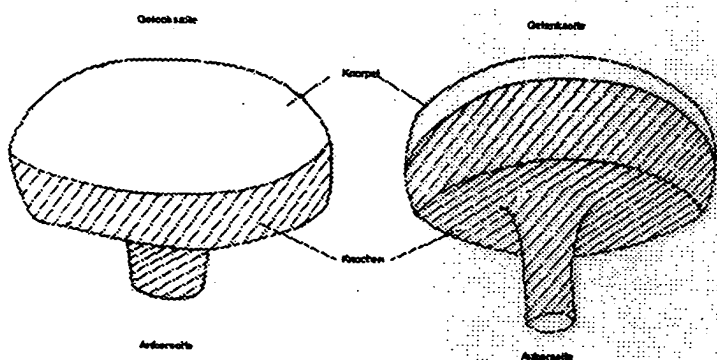
Die vorliegende Erfindung betrifft ein biologisches, zumindest teilweise in vitro hergestelltes Gelenkkonstrukt, das wenigstens ein bioverträgliches Trägermaterial, Knorpelgewebe und Knochengewebe umfaßt, wobei Knorpel- und Knochengewebe fest miteinander verbunden sind. Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung dieses Gelenkkonstrukts. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist Knochengewebe, das transfizierte Zellen enthält, sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung.



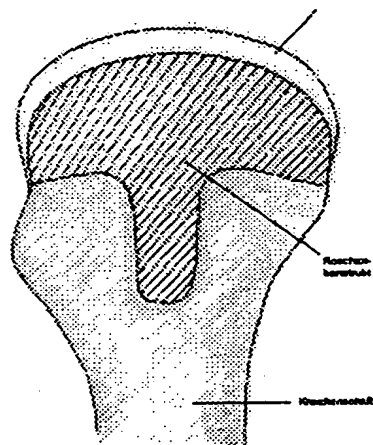
Figur 1a)



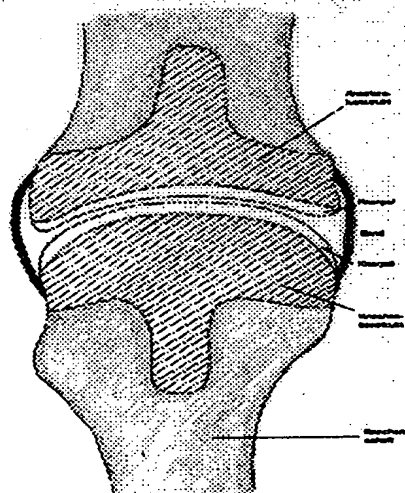
Figur 1b)



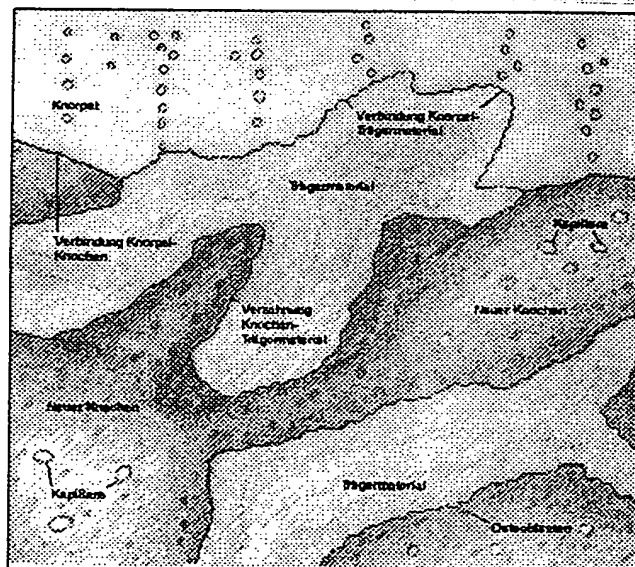
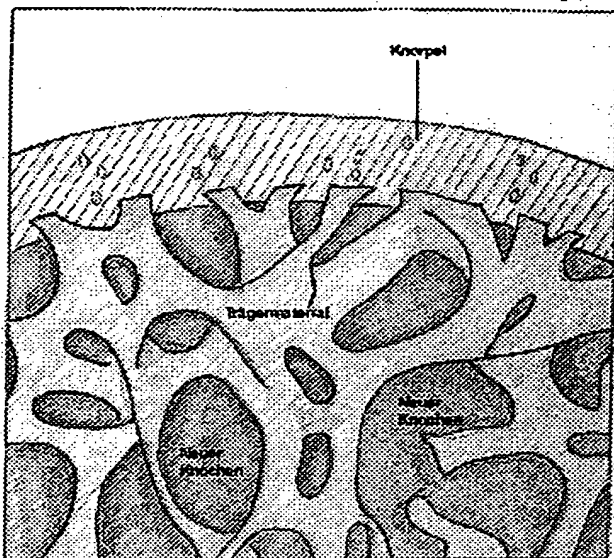
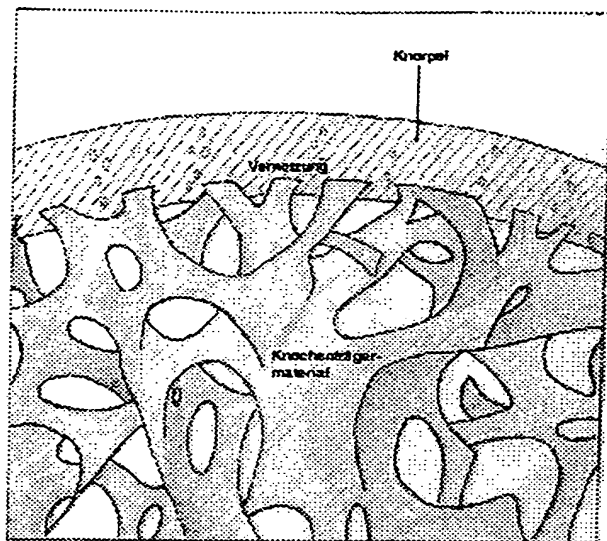
Figur 1c)



Figur 1d)

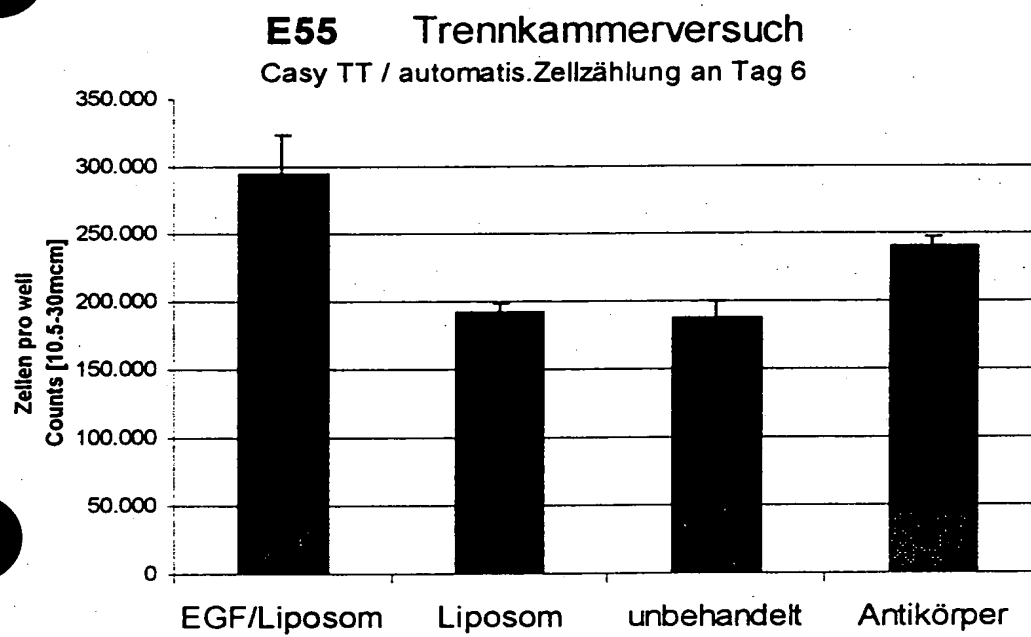


Figur 1e)

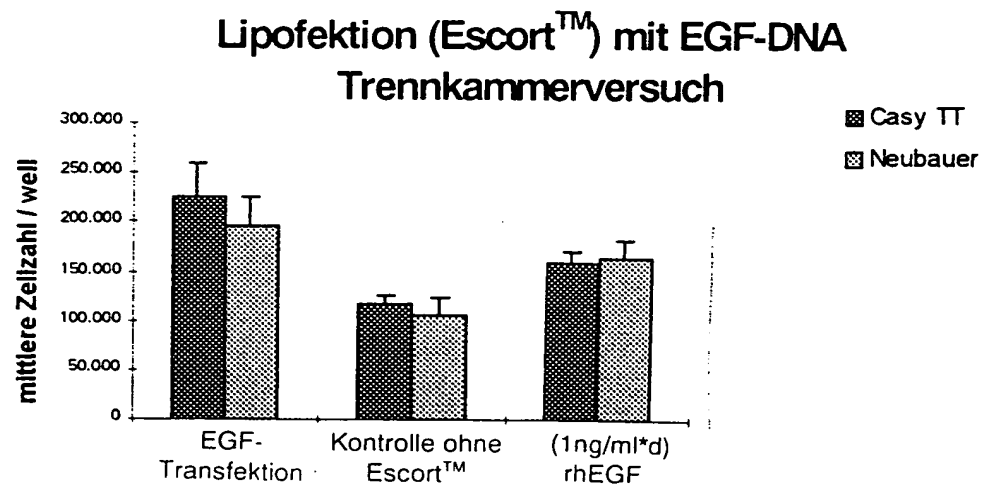




Figur 2

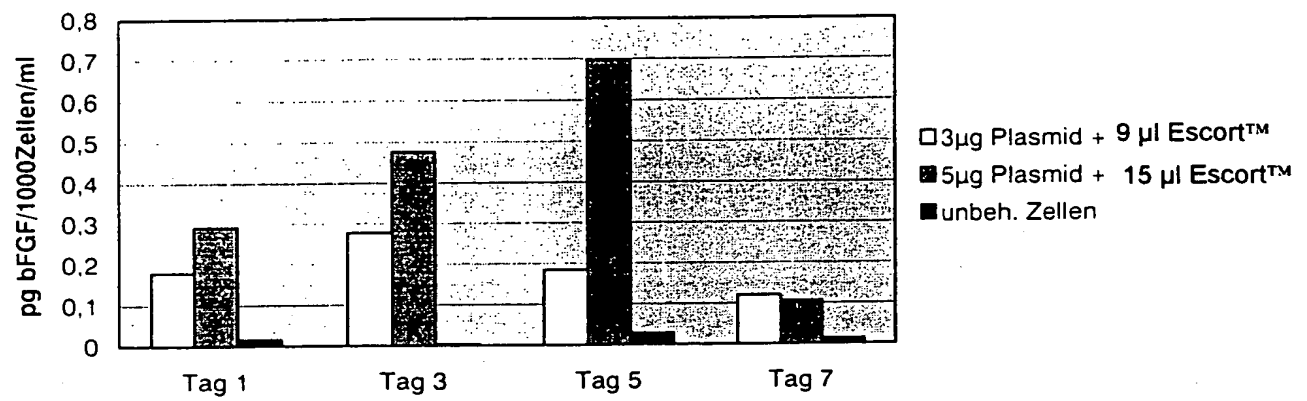


Figur 3



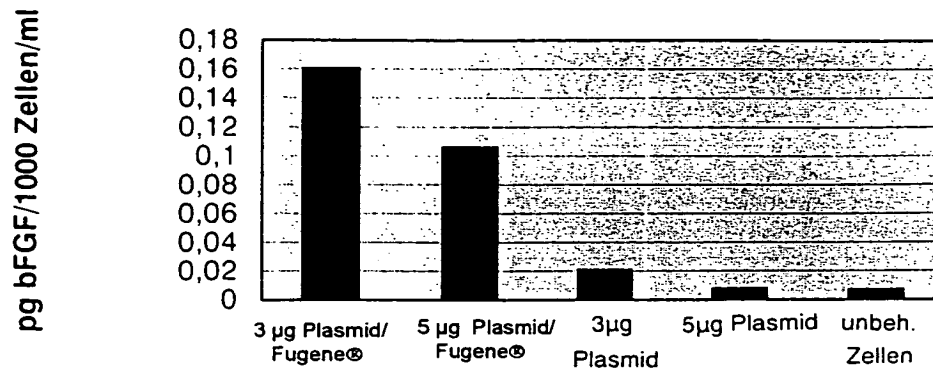
Figur 4

Lipofektion (Escort™) humaner Osteoblasten mit bFGF



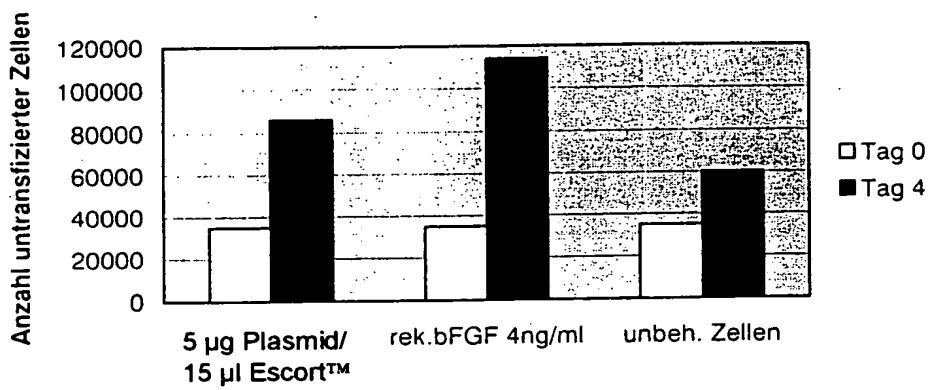
Figur 5

Lipofektion(Fugene) humaner Osteoblasten mit bFGF



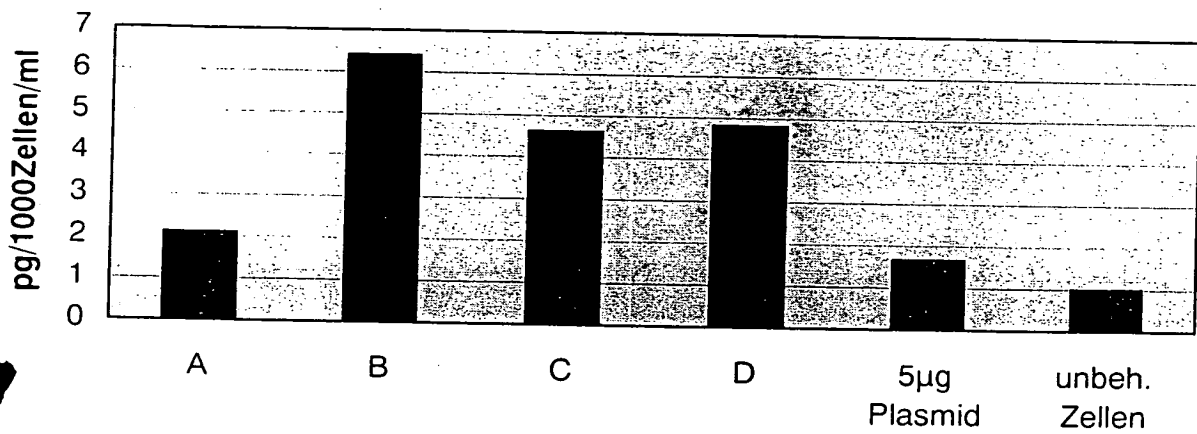
Figur 6

Proliferation humaner Osteoblasten durch  
Transfektion mit bFGF in der Trennkammer



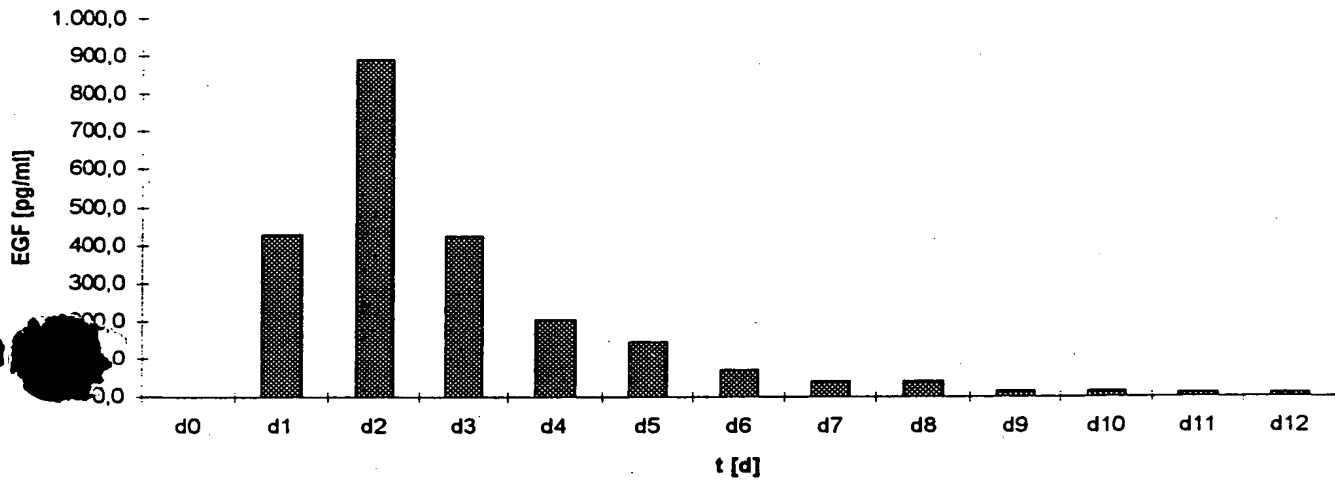
Figur 7

# Lipofektion (Fugene) humaner Osteoblasten mit VEGF



Figur 8

EGF-Expression im Überstand (4ml) nach Elektroporation



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**